

红景天对人皮 HSF 和 HaCaT 细胞的抗衰老作用

周思思, 姜建国

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文采用中波紫外照射的人皮肤成纤维细胞(HSF)和人永生皮肤角质形成细胞(HaCaT)细胞衰老模型, 探索了红景天的4种萃取物—红景天总皂苷、总黄酮、多糖和挥发油的体外抗皮肤衰老作用。结果显示所试的4种萃取物都具有与浓度相依的抗衰老作用, 其效果顺序依次为皂苷>多糖>黄酮>挥发油。其中, 浓度为800 $\mu\text{g/mL}$ 的皂苷的抗衰老效果是维生素C对照组的2倍。黄酮和多糖对HSF细胞具有相当的修复效果, 且都好于挥发性油; 在HaCaT细胞的情况多糖、黄酮和挥发油具有相类似的抗衰老效果。可见红景天的不同粗提物对人皮肤细胞有一定的抗衰老修复能力, 这为深入地研发红景天抗衰老、抗辐射产品提供一定的理论依据。

关键词: 红景天; 中波紫外线; 抗衰老; 人皮肤成纤维细胞; 人永生皮肤角质形成细胞

文章编号: 1673-9078(2018)08-16-23

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.003

Anti-aging Effect of *Rhodiola* on the HSF and HaCaT Cell

ZHOU Si-si, JIANG Jian-guo

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The anti-aging effect of four extracts (saponins, flavonoids, polysaccharides and volatile oils) from *Rhodiola* was investigated using the anti-aging model with damaged human skin fibroblasts (HSF) and (Human immortalized keratinocytes) HaCaT cells irradiated by medium-wavelength UV. The results showed that the test four extracts exhibited a concentration-dependent anti-aging effect on HSF and HaCaT cells, with the decreasing activity in the order: saponins > polysaccharides > flavonoids > volatile oils. The anti-aging activity of saponins at 800 $\mu\text{g/mL}$ was 2 times that of the control (Vc). Flavonoids and polysaccharides have the similar repairing effects on damaged HSF cell, which were better than volatile oils. In the case of the HaCaT cell, polysaccharides, flavonoids and volatile oils had the same anti-aging effects. Therefore, it could be concluded that different extracts of *Rhodiola* have an anti-aging ability to repair damaged human skin cell, which may provide a theoretical basis for the development of *Rhodiola* products with anti-aging and anti-radiation activities.

Key words: *Rhodiola*; ultraviolet B; anti-aging; HSF; HaCaT

红景天根茎提取物(Extracta from stems and leaves of *Rhodiola sachliensis* A. Bor)系从景天科红景天属长白山产高山红景天中提取的浸膏, 已被前苏联广泛用于临床。据报道具有多种药理活性^[1], 含有丰富的黄酮, 多糖, 有机酸和挥发油^[2]等化学成分。近年来的研究发现, 红景天具有抗衰老、抗疲劳和抗自由基损伤等作用^[1]。苗艳波^[3]等大量实验结果表明, 高山红景天及其总皂苷能明显提高老龄小鼠红细胞SOD(超氧化物歧化酶)和CAT(过氧化氢酶)活力, 提高肝组织中GSH-Px(谷胱甘肽过氧化物酶)的活力, 降低血浆中MDA(丙二醛)的含量, 起到减缓衰老的作用; 胡卡明^[4]等观察红景天胶囊治疗中医虚证100例, 结果表明红景天具有健脾益肾、益气生血、保护细胞和延缓衰老的作用; 因此中药红景天在抗衰老方面有

广阔的应用前景, 值得进一步开发。

反复的紫外照射会导致皮肤光老化, 产生大量自由基, 引发皮肤氧化压力、促使蛋白氧化性损伤, 进而会引发皮肤衰老, 甚至是恶性肿瘤^[5]。角质细胞和纤维细胞是皮肤衰老过程中涉及的主要细胞类型, 应用中药提取物抑制皮肤光老化衰老是近些年来研究的热点^[6]。Lim等^[7]以不同立体异构体的人参皂苷作用于中波紫外线(UVB)照射后的角质细胞和纤维细胞为研究对象, 发现人参皂苷Rg3对皮肤光老化抗衰老有保护作用; Kwak等^[8]研究发现桃花乙醇提取物有预防皮肤光老化, 减缓机体衰老的效果, 并检测了相关基因的表达和蛋白的合成量。因此, 为合理开发珍贵药用资源, 本实验研究以红景天为材料, 利用紫外照射人皮肤成纤维细胞(HSF)和人永生皮肤角质形成细胞(HaCaT)受损为模型, 应用红景天4大类粗提物(总皂苷、总黄酮、多糖、挥发油)体外干预中波紫外线(UVB)照射的HSF细胞和HaCaT细胞, 通过观察最大浓度下细胞的形态、存活率和最大浓度

收稿日期: 2018-01-20

基金项目: 广州市科技计划项目(201604020150)

作者简介: 周思思(1994-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物

通讯作者: 姜建国(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物

800 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞上清液中 SOD、GSH-Px、MDA 的含量变化来探讨红景天粗提物对皮肤细胞光老化衰老的保护作用,为进一步分离,纯化红景天抗光老化功效成分及其作用机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和主要仪器

1.1.1 材料和细胞

高山红景天,产自西藏,购于广州清平药材市场,植物由华南农业大学生命科学院郝刚教授鉴定;人永生皮肤角质形成细胞 HaCaT 和人皮肤成纤维细胞 HSF 购于中国科学院干细胞库。

1.1.2 培养基和试剂

DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶消化液、青霉素、链霉素,美国 Gibco 公司;胎牛血清,四季青公司;DMSO, sigma 公司;SOD、GSH-Px、MDA 试剂盒均为南京建成生物工程研究所。

1.1.3 主要实验仪器

CO_2 培养箱,上海博迅实业有限公司;垂直流超净工作台,苏州净化设备有限公司;台式低速离心机,上海安亭科学仪器厂;倒置显微镜,上海光学仪器六厂;多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司;ZF-2 型三用紫外仪,上海市安亭电子仪器厂;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红景天皂苷^[9]、黄酮^[10]的制备

干燥的红景天根茎 2 kg,经过粉碎过筛后按料液比 1:15(m/V),用 75%的乙醇加热回流提取 3 次,合并提取液,用旋转蒸发仪在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩得到乙醇提取物,将乙醇粗提取物在 0~5 $^{\circ}\text{C}$ 冷置 24 h,4000 r/min 高速离心 15 min,倾取上清液,减压浓缩,然后用水溶解,作为上样液。将上样液缓慢加入到已处理过的 D-101 大孔树脂上,先用蒸馏水洗脱 5 个柱体积,洗去水溶性杂质,再用 30%乙醇进行洗脱 5 个柱体积,去除酚类物质,然后以 50%乙醇和 70%乙醇分别洗脱 5 个柱体积,收集各个组分,减压浓缩回收乙醇,真空干燥,得到 50%洗脱部分和 70%洗脱部分。经查文献^[9]以及检测,50%洗脱部分为总皂苷类,70%部分为总黄酮类。

1.2.2 红景天多糖的制备^[11]

称取 100 g 干燥红景天根茎粉末,采用蒸馏水加热回流法提取红景天多糖,按 $m/V=1:10$ 加水回流 2.5 h 后用纱布过滤,重复 2 次,合并两次所得滤液于 4500

r/min 离心 10 min,所得上清液于旋转蒸发仪 60 $^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩至 600 mL。将浓缩的多糖溶液按体积比为 1:1 加入预处理过的 D354FD 树脂于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 3 h,并持续搅拌,重复脱色 3 次,后抽滤得到脱色后的多糖溶液。接着加入 150 mL 体积比为 4:1 的三氯甲烷/正丁醇混合液,磁力搅拌 10 min,转入离心管,4500 r/min 离心 5 min,取水相部分,重复该操作 3 次去除杂蛋白,所得水相部分于旋转蒸发仪 60 $^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩至 200 mL 浓缩液。浓缩液中加入无水乙醇至含醇量达 80%,边加边搅拌,得灰白色絮状沉淀,重复此操作 2 次。4 $^{\circ}\text{C}$ 下隔夜静置,倾出上层清液,余下部分 4500 r/min 离心 8 min 得沉淀,回收上层乙醇溶液。沉淀部分用少量无水乙醇洗涤 4 次,60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干即得红景天多糖。

1.2.3 红景天挥发油的制备^[12]

本研究参照 2010 版《中华人民共和国药典》一部附录中挥发油测定甲法提取红景天中的挥发油。具体步骤为:准确称取 100 g 粉碎后的样品粗粉于 5 L 圆底烧瓶中,加 2 L 蒸馏水,摇匀后浸泡 12 h,连接挥发油提取装置,由上而下,加入蒸馏水到刻度段至溢出为止,煮沸提取至油量不再增加,停止加热,冷却 30 min,将刻度段蒸馏水放出,再用乙醚将冷凝管中的挥发油洗至刻度段,用 100 mL 锥形瓶接收,加入适量无水硫酸钠除去水,用脱脂棉过滤转移至已称重的 50 mL 楔形瓶中,将乙醚旋干,擦干楔形瓶后称其重量,增重即为挥发油质量,记录并计算挥发油得率。

1.2.4 四大类样品含量的测定

皂苷含量的测定,参照 Hu 等^[13]的方法。

黄酮含量的测定,参照 Chang 等^[14]的方法。

多糖含量的测定,参照崔宏春等^[15]的方法。

挥发油含量的测定,参照刘本等^[16]的方法。

1.2.5 细胞培养

HSF 和 HaCaT 细胞用含 1%双抗、10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,每 2~3 d 换液,取对数生长期的细胞进行试验。

1.2.6 细胞衰老模型的建立^[17]

建模实验分 2 组,设空白对照组以及 6~7 个不同能量 UVB 照射实验组。空白对照组加 100 μL 培养基,不进行 UVB 照射;实验组加入适量 PBS (磷酸缓冲盐溶液) 反复洗至无色后加入 100 μL PBS,分别放在不同能量 UVB 灯下照射,灯源和培养瓶间距 15 cm,实验组经照射后,弃去 PBS,加入 100 μL 培养液,正常培养;24 h 后,MTT 法检测 2 组细胞的增殖抑制率;

增殖抑制率($\%$)=(1-照射组 OD 值/空白对照组

OD)×100%

据文献^[18]报道,当增殖抑制率为 50%时,说明此细胞建模成功,此时的辐射能量即为衰老模型的实验能量,后续实验均选用此能量为细胞实验辐射能量。

1.2.7 实验分组

分别检测 4 大类红景天样品对 HSF 和 HaCaT 细胞的衰老修复能力,每种细胞实验设 3 个组,分别为阳性对照组(上述确定能量照射,Vc 浓度: 25、50、100、200、400, 800 μg/mL),实验药物组(上述确定能量照射,加含不同浓度红景天 4 个样品的 DMEM 完全培养液: 25、50、100、200、400、800 μg/mL),空白照射对照组(上述确定能量照射,加正常 DMEM 完全培养液),每组设 6 个平行复孔。

1.2.8 方法

根据文献^[19]稍作修改,取处于对数生长期的皮肤细胞,以 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,调整细胞浓度 1×10⁴ 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,常规培养至细胞贴壁后进行能量照射处理,再加药保护继续培养 24 h,每孔加 20 μL MTT 和 180 μL 基础培养基,继续培养 4 h,收集细胞上层培养液按照试剂盒方法测定 SOD、GSH-Px、MDA 的含量,培养板中继续每孔加 150 μL DMSO,震荡 10 min,用酶标仪检测其在 490 nm 波长处的 OD 值,按下式计算样品对细胞衰老的修复效果:

样品修复效果=照射加药 OD 值/照射不加药 OD 值×100%

- 当比值>100%,说明药物对细胞损伤起修复作用;
- 当比值=100%,说明药物对细胞损伤没有作用;
- 当比值<100%,说明药物对细胞起伤害作用。

1.2.9 数据统计分析

使用 Excel 和 SPSS 13 软件对数据进行统计分析,MTT 试验检验做 6 个复孔平行,其它实验均做 3 组平行实验,结果以平均值±标准方差表示。

2 结果与讨论

2.1 含量测定结果

表 1 红景天四大类粗提物的含量测定结果

Table 1 The determination results of four kinds of extracts of

Rhodiola

	皂苷	黄酮	多糖	挥发油
得率/%	8.54±0.51	5.38±0.33	18.14±0.15	0.12±0.71
纯度/%	56.82±1.21	44.14±0.58	55.58±0.47	45.28±0.39

2.2 细胞衰老模型的建立

紫外照射是引起皮肤老化的一种重要方式,它可以轻易的进入细胞内部,引起脂质过氧化、DNA 损伤等,从而使细胞衰老^[20]。为了建立紫外照射对皮肤细胞的损伤衰老模型,采用不同能量(50、60、70、80、90、100 mJ/cm²)处理皮肤细胞,通过细胞的增殖抑制率大小来反映样品对光老化衰老的修复能力。

2.2.1 不同 UVB 能量照射对 HSF 细胞的细胞增殖影响

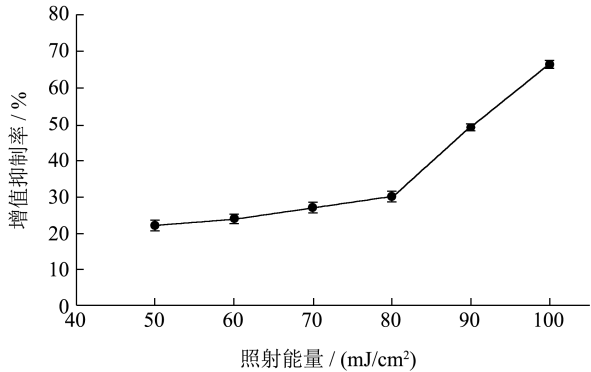


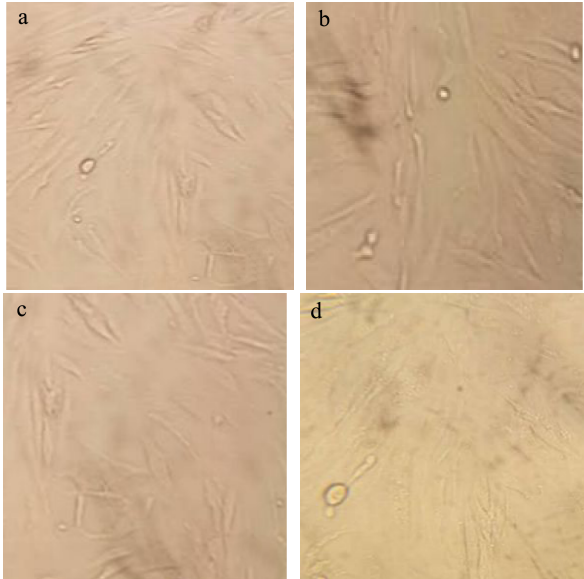
图 1 不同能量对 HSF 细胞增殖抑制的影响

Fig.1 Effects of different energies on the proliferation inhibition of HSF cell

由图 1 可知,随着辐射能量的增大,细胞的增殖抑制率越高,即细胞死亡越多,说明紫外对细胞有一定的杀害能力。

当辐射能量在 50 mJ/cm²时,细胞增殖抑制率为 20%;当辐射能量在 100 mJ/cm²时,细胞增殖抑制率达到 65%;而当辐射能量正好达到 90 mJ/cm²,细胞的增殖抑制率为 50%。根据文献得增殖抑制率为 50%时 HSF 细胞建模成功,故在后续实验过程中,均选用 90 mJ/cm²照射 HSF 细胞。

2.2.2 不同能量 UVB 照射对 HSF 细胞生长状态的影响



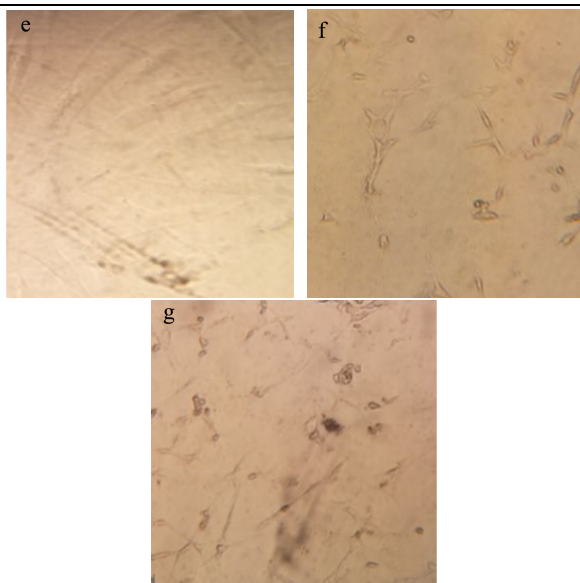


图2 不同能量 UVB 照射对 HSF 细胞生长形态的影响

Fig.2 Effects of different UVB energy rays on growth morphology of HSF cell

注: a, 空白对照组 (未照射); b, 实验组 (50 mJ/cm² 能量照射); c, 实验组 (60 mJ/cm² 能量照射); d, 实验组 (70 mJ/cm² 能量照射); e, 实验组 (80 mJ/cm² 能量照射); f, 实验组 (90 mJ/cm² 能量照射); g, 实验组 (100 mJ/cm² 能量照射)。

正常情况下, HSF 细胞贴壁生长, 成束状或纤维状, 数量较多。随着紫外辐射能量的加大, 细胞数量减少, 且形态变得不规则。当达到 100 mJ/cm² 能量照射时, 细胞大部分死亡, 形态变得难以分辨; 在照射能量为 90 mJ/cm² 时, 细胞存活率为 50%, 此时的细胞增殖率更适合实验要求, 故选用此能量进行实验。

2.2.3 不同能量 UVB 照射对 HaCaT 细胞的细胞增殖影响

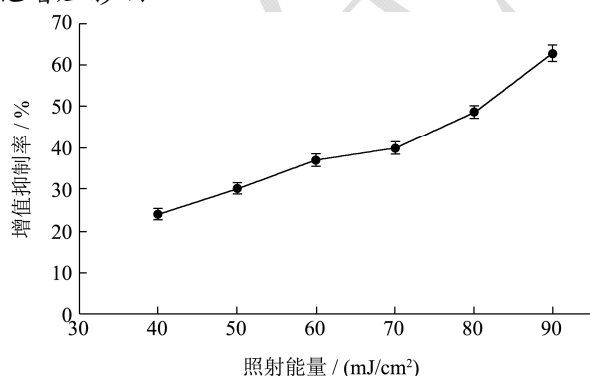


图3 不同能量对 HaCaT 细胞增殖抑制的影响

Fig.3 Effects of different energies on the proliferation inhibition of HaCaT cell

同样, 由图 3 可知, 随着辐射能量的增大, 细胞死亡得越多。辐射能量在 40 mJ/cm² 时, 细胞增殖抑制率为 20%; 当辐射能量在 90 mJ/cm² 时, 细胞增殖抑制率达到 60%; 而当辐射能量达到 80 mJ/cm², 细

胞的增殖抑制率正好为 50%, 说明此能量照射下, HaCaT 细胞建模成功, 在后续实验过程中, 均选用 80 mJ/cm² 能量照射 HaCaT 细胞。

2.2.4 不同能量 UVB 照射对 HaCaT 细胞生长状态的影响

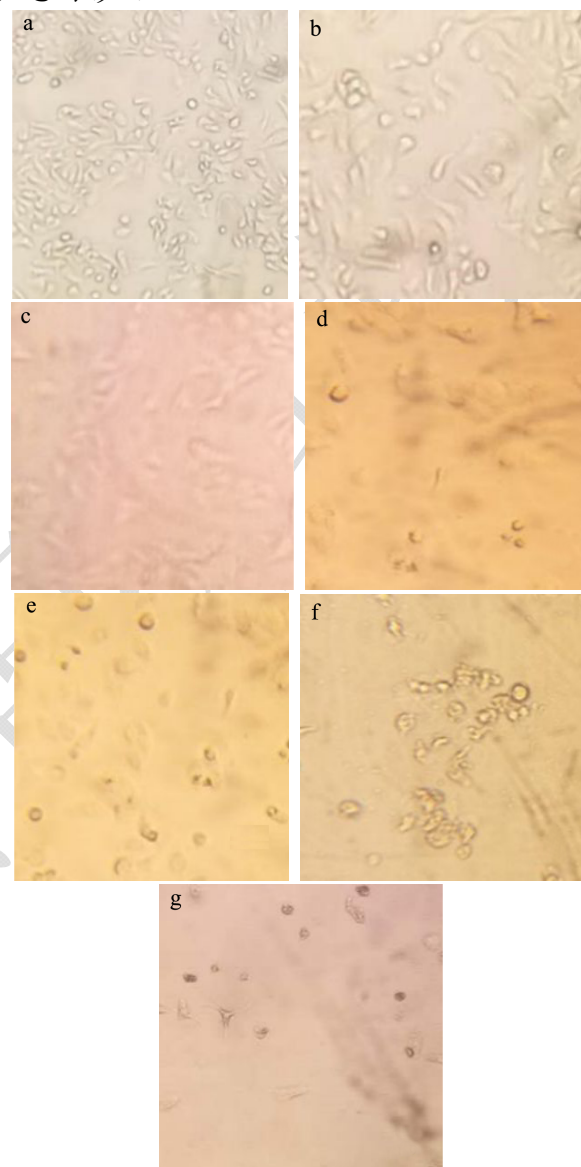


图4 不同能量 UVB 照射对 HaCaT 细胞生长形态的影响

Fig.4 Effects of different UVB energy rays on growth morphology of HaCaT cell

注: a, 空白对照组 (未照射); b, 实验组 (40 mJ/cm² 能量照射); c, 实验组 (50 mJ/cm² 能量照射); d, 实验组 (60 mJ/cm² 能量照射); e, 实验组 (70 mJ/cm² 能量照射); f, 实验组 (80 mJ/cm² 能量照射); g, 实验组 (90 mJ/cm² 能量照射)。

正常情况下, HaCaT 细胞为牢固贴壁生长的不规则细胞, 多为椭圆形和多角形。细胞在紫外照射下, 数量逐渐减少, 形态发生巨大变化; 当辐射能量达到 90 mJ/cm² 时, 细胞大部分死亡, 且形态已分辨不出; 在照射能量为 80 mJ/cm² 时, 实验存活率为 50%, 此

时的细胞增殖率更适合实验要求, 故选用此能量进行实验。

2.3 不同样品对 HSF 细胞抗衰老效果的影响

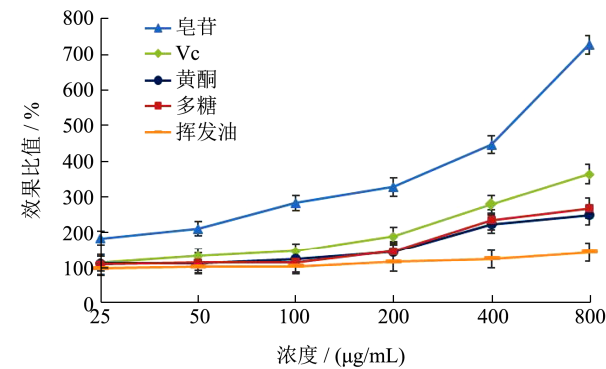


图5 不同红景天样品对辐射后 HSF 细胞抗衰老效果图

Fig.5 Effects of different *Rhodiola* samples on anti-aging restoration of HSF cell after radiation

本实验以 HSF 细胞为研究目标, 采用 MTT 法检测 90 mJ/cm² 的 UVB 照射后的 HSF 细胞经红景天 4 大类样品作用 24 h 后的光老化修复作用的情况, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, 随着浓度的增大, 样品的修复细胞衰老效果越来越好, 且呈现良好的量效关系, 但是不同样品在不同浓度下对 HSF 细胞衰老修复能力各有不同。其中总皂苷样品的衰老修复效果最好, 且好于阳性对照 Vc; 多糖和黄酮样品在低浓度时, 效果一样, 在较高浓度时, 多糖的效果好于黄酮; 挥发油样品的效果一般, 在低浓度时对受损伤细胞几乎没有抗衰老能力, 较高浓度开始表现出修复能力。

2.4 不同样品对 90 mJ/cm² 的 UVB 照射后

HSF 细胞衰老修复生长状态的影响

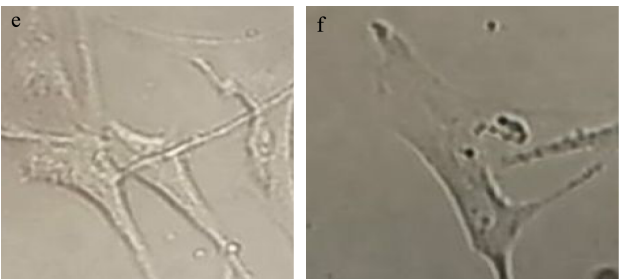
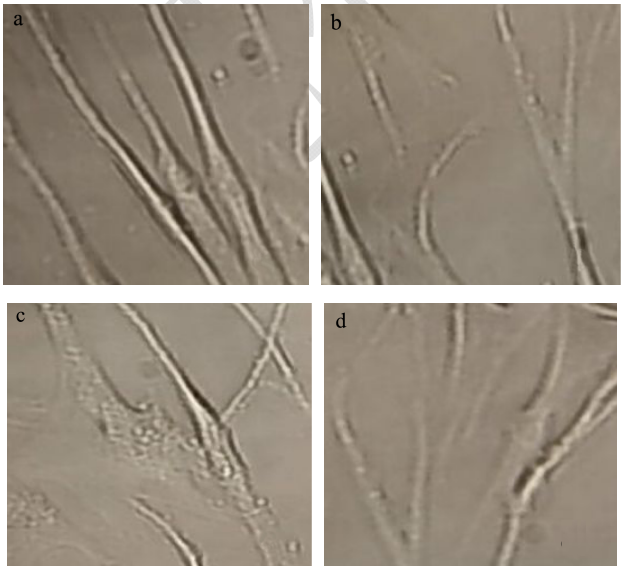


图6 不同样品(800 μg/mL)对 90 mJ/cm² 的 UVB 照射后 HSF 细胞生长形态的影响

Fig.6 Effects of different samples (800 g/mL) on the growth morphology of HSF cells after UVB irradiation of 90 mJ/cm²

注: a.皂苷; b.Vc; c.黄酮; d.多糖; e.挥发油; f.照射对照组(照射, 不加样品)。

由上图细胞的形态和数量可看出, HSF 细胞在 800 μg/mL 样品干预 24 h 后, 对细胞衰老有较好的修复作用。与未加药照射组相比, 总皂苷的修复能力最强, 细胞纤维状形态最为明显, 数量最多, 且好于阳性对照 Vc; 多糖和黄酮对细胞的修复能力不相上下, 细胞形态呈纤维状, 数量未明显减少; 相对而言, 挥发油的效果一般, 细胞之间连接疏松, 间隙变大, 形态各异, 突起增加, 呈不规则形, 但是和未加药照射组对比, 四种样品的细胞数量还是较多, 说明红景天四大类粗提物都具有抗衰老效果。

表2 不同样品(800 μg/mL)对 HSF 细胞中 SOD、GSH-Px、MDA 的影响

Table 2 Effects of different samples (800 μg/mL) on SOD, GSH-Px and MDA in HSF cells

组别	SOD/(nmol/mL)	GSH-Px/(nmol/mL)	MDA/(u/mL)
空白组	32.4±3.2 ^d	203.7±22.6 ^a	8.2±1.8 ^a
模型组	18.4±2.3 ^a	169.4±20.1 ^a	16.8±2.4 ^c
Vc 组	29.5±1.8 ^{cd}	190.3±15.3 ^a	10.2±1.7 ^a
皂苷组	30.7±2.4 ^{cd}	198.4±18.4 ^a	9.3±1.4 ^a
黄酮组	26.2±2.9 ^{bc}	184.1±20.3 ^a	14.4±2.6 ^{bc}
多糖组	27.5±2.1 ^{bc}	186.8±14.9 ^a	11.7±1.4 ^{ab}
挥发油组	24.1±1.8 ^b	180.6±23.1 ^a	15.8±2.3 ^c

注: 同列不同字母表示显著性差异。P<0.05,下同

2.5 不同样品对 HSF 细胞中 SOD、GSH-Px、

MDA 活性的影响

由 800 μg/mL 不同样品作用于细胞 24 h 后测定细胞上清液中相关酶活性数据如表 2, 可发现与空白组相比, 模型组中 SOD、GSH-Px 活性显著降低($p<0.05$), MDA 活性显著升高 ($p<0.05$); 和模型组相比, 四个

样品组中 SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($p<0.05$), MDA 活性显著降低($p<0.05$),说明四大类样品对 HSF 细胞抗衰老可能与抗氧化, 增强清除机体自由基的机制相关。

2.6 不同样品对 HaCaT 细胞抗衰老效果的影响

响

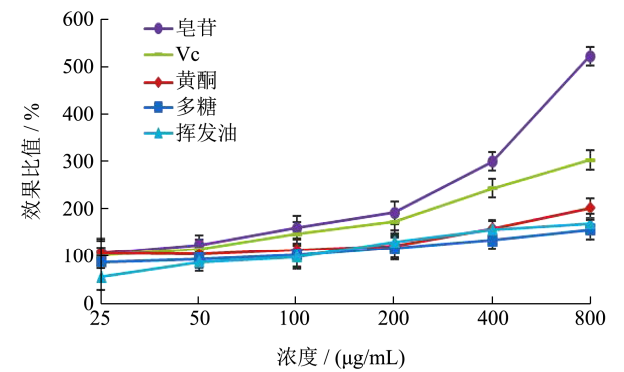


图7 不同红景天样品对辐射后HaCaT细胞抗光老化修复效果图

Fig.7 Effects of different Rhodiola samples on anti-light aging restoration of HaCaT cell after radiation

本实验以 HaCaT 细胞为研究目标, 采用 MTT 法检测 80 mJ/cm² 的 UVB 照射后的 HaCaT 细胞经红景天 4 种样品作用 24 h 后的光老化修复作用的情况, 结果如图 7 所示。由图 7 可知, 随着样品浓度的增大, 其修复细胞衰老效果越来越好, 呈现良好的量效关系, 但是不同样品在相同浓度下对 HFF 老化修复能力也各有不同。其中总皂苷样品的抗衰老效果最好, 最明显, 且远远好于阳性对照 Vc; 多糖、黄酮和挥发油样品在低浓度时没有表现出强的抗衰老能力, 但高浓度时有一定的抗衰老效果。

2.7 不同样品对 80 mJ/cm² 的 UVB 照射后

HaCaT 细胞衰老修复生长状态的影响

由图 8 可看出, 四大类 800 μg/mL 样品干预 HaCaT 细胞 24 h 后, 都对细胞衰老起较好的修复作用。和照射未加药组对比, 皂苷、黄酮、多糖和挥发油的细胞数量均增多, 细胞形态呈较好的梭状; 其中皂苷的效果最为明显, 且好于阳性对照 Vc 组, 细胞数量最多, 形态呈梭形无明显变化; 多糖、黄酮和挥发油样品对细胞的修复能力一样, 细胞形态呈梭状或椭球状, 数量略微减少, 细胞变圆缩短; 但是和未加药的照射组对比, 细胞增殖未受到明显限制, 再一次说明红景天具有抗衰老效果。

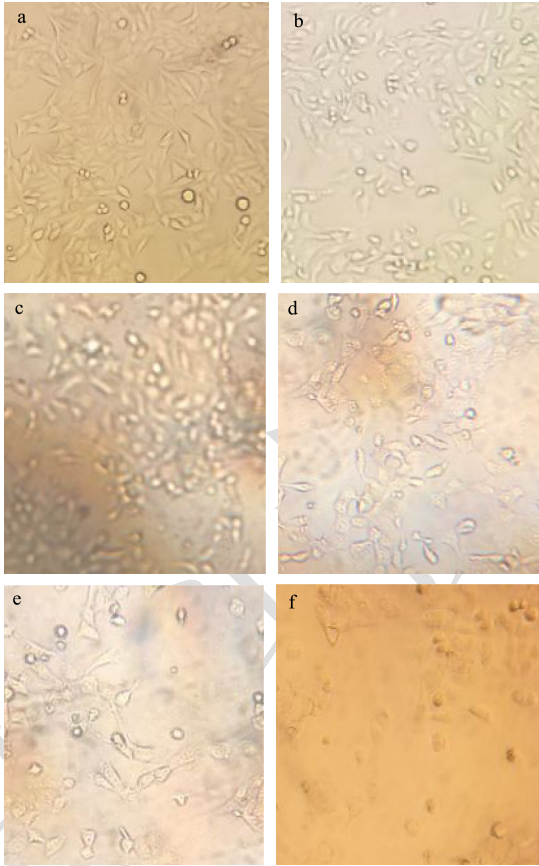


图8 不同样品(800 μg/mL)对80 mJ/cm²的UVB照射后HaCaT细胞生长形态的影响

Fig.8 Effects of different samples (800 μg/mL) on the growth morphology of HaCaT cell after UVB irradiation of 80 mJ/cm²

注: a.皂苷; b.Vc; c.黄酮; d.多糖; e.挥发油; f.照射对照组(照射, 不加样品)。

2.8 不同样品对 HaCaT 细胞中 SOD、GSH-Px、

MDA 活性的影响

表3 不同样品(800 μg/mL)对HaCaT细胞中SOD、GSH-Px、MDA的影响

Table 3 Effects of different samples (800 μg/mL) on SOD, GSH-Px and MDA in HaCaT cells			
组别	SOD/(nmol/mL)	GSH-Px/(nmol/mL)	MDA/(u/mL)
空白组	30.4±2.2 ^e	183.7±18.6 ^a	7.2±2.1 ^a
模型组	17.4±3.3 ^a	149.4±20.1 ^a	14.8±1.4 ^d
Vc组	25.5±1.8 ^{cd}	176.3±11.3 ^a	9.2±1.3 ^{ab}
皂苷组	28.7±2.1 ^{de}	180.4±13.4 ^a	8.3±2.4 ^{ab}
黄酮组	21.2±1.9 ^{abc}	163.1±18.3 ^a	11.4±1.6 ^{bcd}
多糖组	22.5±2.9 ^{bc}	166.1±20.9 ^a	10.2±2.4 ^{abc}
挥发油组	19.1±2.8 ^{ab}	158.6±18.1 ^a	12.8±1.8 ^{cd}

由 800 $\mu\text{g/mL}$ 不同样品作用于细胞 24 h 后测定细胞上清液中相关酶活性数据如表 3。我们发现与空白组相比,模型组中 SOD、GSH-Px 活性显著降低 ($p<0.05$),MDA 活性显著升高 ($p<0.05$);和模型组相比,四个样品组中 SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($p<0.05$),MDA 活性显著降低 ($p<0.05$),说明四大类样品对 HaCaT 细胞抗衰老可能与同 HSF 细胞一致,也和抗氧化,增强清除机体自由基的机制相关。

3 结论

3.1 红景天经过加热回流提取,真空浓缩后过 D-101 大孔树脂,不同梯度乙醇洗脱得到红景天总皂苷,总黄酮,得率分别为 8.54%和 5.38%;利用水提法,脱色脱蛋白纯化后得到红景天粗多糖,得率为 8.14%;醇提加热回流法得到红景天挥发油,得率为 0.12%。并测定了相应的含量,得到皂苷的纯度为 56.82%,黄酮的纯度为 34.14%,多糖的纯度为 55.58%,挥发油的纯度为 45.28%,整体上说,传统的加热提取法的得率和纯度都不高。

3.2 角质形成细胞和纤维细胞位于表皮层,是 UVB 波长能量作用的主要靶部位。UVB 诱发红斑和日晒伤,并与皮肤衰老发生密切相关。利用中波紫外照射细胞,MTT 法检测细胞存活率,建立了 HSF 和 HaCaT 细胞体外光老化衰老模型:未照射组正常培养 24 h 后的细胞形态一致,边界清楚,排列紧密,而紫外照射的细胞随着照射能量增加,细胞数量减少,贴壁性降低,细胞间隙越来越大,在 90~100 mJ/cm^2 时,细胞裂解成细胞碎片,并有大量漂浮细胞,因此选定细胞存活率为 50%左右时的照射能量为模型能量,其中 HaCaT 细胞光老化衰老模型辐射能量为 80 mJ/cm^2 ,HSF 细胞光老化衰老模型辐射能量为 90 mJ/cm^2 。

3.3 在以 HSF 和 HaCaT 细胞体外光老化衰老模型基础上测定了红景天 4 个样品的效果,通过观察细胞存活率、最大浓度下细胞形态和细胞上清液中 SOD、GSH-Px、MDA 的含量活性得出结论,红景天四大类抗衰老效果分别为:皂苷>多糖>黄酮>挥发油,其中总皂苷抗衰老修复效果显著高于其它 3 种样品,且与阳性对照组相比,皂苷组细胞数目较多,形态未发生明显变化,并且与其浓度成量效关系,细胞上清液中测得的抗氧化酶活性最高;据文献报道,红景天抗光老化衰老效果可能是红景天皂苷对皮肤角质层有很好的亲和性和穿透力,能有效进至皮肤层,并逐步释放出来,起到修复作用,此外皂苷还有促进细胞更新的作用,促进成纤维细胞的生长,从而增强皮肤的弹性,延缓皮肤皱纹的发生,达到抗光老化衰老的目的;多

糖组抗衰老的效果可能是通过增强细胞免疫功能,提高抗氧化能力,直接清除自由基等途径;黄酮组的效果可能是红景天中含有的抗氧化的黄酮类是广谱 ROS 清除剂,可提高肝中 SOD 活性及非酶抗氧化物质 GSH-Px 的含量,减缓机体中自由基的生成,起到抗光老化衰老的作用;具体红景天的抗光老化衰老机制有待进一步研究,此项研究只为红景天在抗衰老,抗辐射方面提供了研究基础,对于红景天中具体起作用成分可进一步的分离纯化,从而更全面地对红景天进行研究。

参考文献

- [1] Panossian A, Wikman G, Sarris J. *Rosenroot (Rhodiola rosea): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy* [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(7): 481-493
- [2] Lei Y, Nan P, Tsering T, et al. Interpopulation variability of rhizome essential oils in *Rhodiola crenulata* from Tibet and Yunnan, China [J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2004, 32(6): 611-614
- [3] 苗艳波,师海波,孙英莲,等.高山红景天总甙的抗衰老作用[J].*中药药理与临床*,2004,20(5):20-21
MIAO Yan-bo, SHI Hai-bo, SUN Ying-lian, et al. The anti-aging effect of the total glucoside of high mountain rhodiola [J]. *Chinese Medicine Pharmacology and Clinic*, 2004, 20(5): 20-21
- [4] 胡卡明,王尊凤.红景天胶囊治疗中医虚证 100 例临床报告[J].*成都中医药大学学报*,1998,2:17-19
HU Ka-ming, WANG Zun-feng. Clinical report of 100 cases of deficiency syndrome of Chinese medicine in *Rhodiola capsule* [J]. *Journal of Chengdu University of TCM*, 1998, 2: 17-19
- [5] 陶冶,张小青.绞股蓝总皂苷对光老化 HaCaT 细胞中 p38MAPK 蛋白和 c-Jun mRNA 表达的抑制作用[J].*吉林大学学报(医学版)*,2012,38(6):1147-1151
TAO Ye, ZHANG Xiao-qing. Gypenosides intervention photoaging HaCaT Cells to HSF Cells in p38MAPK signal pathway [J]. *Journal of Jilin University(Medicine Edition)*, 2013, 38(6): 1147-1151
- [6] Lee Y R, Noh E M, Jeong E Y, et al. Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF-kappaB pathway in human dermal fibroblasts [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2009, 41(8): 548
- [7] Jim L C, Choi W Y, Jung H J. Stereoselective skin anti-photoaging properties of ginsenoside Rg3 in

- UV-B-irradiated keratinocytes [J]. Biol. Pharm. Bull, 2014, 37(10): 1583-1590
- [8] Kwak C S, Yang J. Prevention effect of prunus persica flos Extract from reactive oxygen species generation and matrix metalloproteinases production induced by UVB irradiation in human skin cells [J]. Asian Journal of Beauty and Cosmetology, 2016, 14(2): 179-190
- [9] 秦勇.苦丁茶总皂苷提取纯化工艺研究[D].长沙:湖南省中医药研究院,2002
- QIN Yong. Studies on extraction&purification processes of total saponins of *Ilex kudingcha* [D]. Changsha: Hunan Collage of TCM, 2002
- [10] 谭林,郭增军,徐颖.大孔吸附树脂纯化小丛红景天总黄酮的初步研究[J].中药材,2008,31(11):1740-1743
- TAN Lin, GUO Zeng-jun, XU Ying. Preliminary study on purification technics of total flavonoids in *Rhodiola dumulosa* by macroporous resin [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(11): 1740-1743
- [11] 孙萍,李艳,崔琳.狭叶红景天多糖的微波提取及含量测定[J].现代中药研究与实践,2002,16(6):24-25
- SUN Ping, LI Yan, CUI Lin. Microwave extraction and determination of polysaccharide in *Rhodiola kirilowii* Rgl. ex maxim [J]. Primary Journal of Chinese Materia Medica, 2002, 16(6): 24-25
- [12] 中华人民共和国卫生部药典委员会编,中华人民共和国药典(一部)[M].北京:人民卫生出版社,1964
- The pharmacopoeia committee of the ministry of health of the People's Republic of China, Pharmacopoeia of the People's Republic of China (part 1) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1964
- [13] Hu T, Guo Y Y, Zhou Q F, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total saponins from *Eclipta prostrata* L. using response surface methodology [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(9): 975-982
- [14] Chang C C, Yang M H, Wen H M, et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods [J]. Journal of Food & Drug Analysis, 2002, 10(3): 178-182
- [15] 崔宏春.绿茶水溶性多糖含量测定方法研究[D].北京:中国农业科学院,2009
- CUI Hong-chun. Study on the content determination method of green tea water-soluble polysaccharide [M]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009
- [16] 吕荷.中药挥发油测定方法研究[J].中成药,2003, 25(1):78-80
- LV He. Study on determination method of volatile oil of traditional Chinese medicine [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2003, 25(1): 78-80
- [17] 史飞,李铀,王毅侠,等.红景天对经 UVA/UVB 辐射的成纤维细胞生长形态的影响[J].北京中医药,2010,29(8):627-631
- SHI Fei, LI Zhou, WANG Yi-xia, et al. The effect of salidroside on the growth morphology of fibroblast in UVA/UVB radiation [J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 29(8): 627-631
- [18] 张丹.健脾益肾方对大鼠肾小管上皮细胞氧化应激的保护作用及其机制研究[D].郑州:河南中医药大学,2015
- ZHANG Dan. Research on the Protective Effect and the mechanism of Jianpi Yishen decoction on oxidative stress in renal tubular epithelial cells [D]. Zhengzhou: Henan University of traditional Chinese Medicine, 2015
- [19] Xu W L, Liu J R, Liu H K, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by γ -tocotrienol in human colon carcinoma HT-29 cells [J]. Nutrition, 2009, 25(5): 555-566
- [20] Fagot D, Asselineau D, Bernerd F. Direct role of human dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation [J]. Archives of Dermatological Research, 2002, 293(11): 576-583